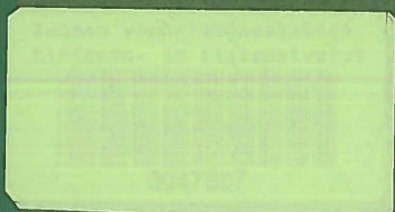


VESIHALLITUKSEN MONISTESARJA

1982:98

VESIHALLINNOSSA KÄYTETTÄVÄT KALOJEN
KLIINIS-KEMIAALLISET JA HISTOLOGISET
MÄÄRITYSMENETELMÄT

Marja Ruoppa



VAR 08
Vesihallitukseen

V E S I H A L L I T U K S E N M O N I S T E S A R J A

1982:98

VESIHALLINNOSSA KÄYTETTÄVÄT KALOJEN
KLIINIS-KEMIAALLISET JA HISTOLOGISET
MÄÄRITYSMENETELMÄT

Marja Ruoppa

VESIHALLITUKSEN
KIRJASTO

Vesihallitus
Helsinki 1982

Tekijä on vastuussa julkaisun sisällöstä eikä siihen voida vedota vesihallituksen virallisena kannanottona.

S I S Ä L L Y S

| | Sivu |
|--|------|
| 1. JOHDANTO | 5 |
| 2. NÄYTTEENOTTOA EDELTÄVÄ KÄSITTELY | 5 |
| 2.1 Kalojen hankinta | 5 |
| 2.2 Lämpötilan ja vuodenajan vaikutus | 6 |
| 2.3 Kuljetus | 6 |
| 2.4 Kalojen sumputus yksitellen | 6 |
| 3. NÄYTTEENOTTOTEKNIIKAT | 6 |
| 3.1 Kalan tainnuttaminen | 6 |
| 3.2 Verinäytteenottotavat | 7 |
| 3.3 Näytteen käsittely | 7 |
| 3.4 Kudosnäytteenotto | 7 |
| 3.5 Kalanäytteidenottosuositus | 8 |
| 4. NÄYTTEIDEN ANALYSOINTI | 9 |
| 4.1 Veren hematokriittiarvo | 9 |
| 4.2 Veren hemoglobiinipitoisuus | 9 |
| 4.3 Veren ja plasman glukooši- l. sokeri- pitoisuus | 9 |
| 4.4 Veren ja kudoksen laktaatti- l. maito- happopitoisuus | 11 |
| 4.5 Maksan ja lihaksen glykokeenipitoisuus | 12 |
| 4.6 Plasman ja lihaksen kokonaislipidi- pitoisuus | 13 |
| 4.7 Plasman ja kudoksen proteiinipitoisuus | 14 |
| 4.8 Plasman ja kudoksen ionipitoisuudet | 15 |
| 4.9 Kudoksen vesipitoisuus | 16 |
| Entsyymimääritykset | 17 |
| 4.10 Laktaattidehydrogenaasiaktiivisuus (LDH) | 17 |
| 4.11 Koliiniesteraasiaktiivisuus (GHE) | 20 |
| 4.12 Aspartaattiaminotransferaasiaktiivisuus (ASAT l. GOT) | 25 |
| 4.13 Alaniiniaminotransferaasiaktiivisuus (ALAT l. GPT) | 27 |
| 4.14 Alkaalinen fosfataasi (AP) aktiivisuuden määritys | 30 |
| 4.15 Hapan fosfataasin aktiivisuuden määritys | 30 |
| 4.16 ATP-määritys | 31 |
| 4.17 Delta-aminolevuliinihappodehydrataasi- aktiivisuus (ALA-D) | 32 |
| Vierasaineenvaihdunta | 33 |
| 4.18 Beta-glukuronidaasiaktiivisuus | 33 |
| 4.19 UDP-glukuronosyyli transferaasiaktiivi- suus | 34 |
| 5. HISTOLOGISTEN NÄYTTEIDEN KÄSITTELY | 35 |
| 6. NÄYTTEIDEN VÄRJÄÄMINEN | 36 |
| 7. FIKSOINTILIUKOKSET | 37 |
| 8. KIRJALLISUUS | 38 |

1. JOHDANTO

Myrkyllisiä aineita sisältävien jätevesien vesistövaikutusten selvittämiseksi on vesihallituksessa fysikaalis-kemiallisten, mikrobiologisten sekä kaloihin kertyvien aineiden määrittysten lisäksi otettu käyttöön kalafysiologisia ja -histologisia määrittäyksiä. Kalojen myrkyllisyystestejä tehdään joko laboratorio-oloissa, allaskokein tehtaalla tai kenttäolosuhteissa (Valvontaohje Nro 35 27.8.1980, Myrkyllisyystestien käyttö vesiensuojelussa).

Kalafysiologisessa tutkimuksessa on viime aikoina tapahtunut keskittymistä tiettyihin lajeihin. Lohikaloista kirjolohta ja taimenta käytetään yleisesti koekaloina. Luonnonkaloista ovat meillä tutkimusten kohteina olleet hauki, särki, ahven sekä siika.

Jotta kalatesteistä saatuja tuloksia voitaisiin tehokkaasti käyttää hyödyksi tulee koe-olosuhteet, kalojen käsittely sekä näytteenotto ja käsittely vakioida mahdollisimman tarkasti jokaisessa kalaryhmässä (koe + kontrolli).

Kansainvälisiä standardeja on laadittu lähinnä tasalämpöisessä vedessä eläville akvaariokaloille, jotka lisääntyvät useita kertoja vuodessa. Tällöin ovat lämpötilan lisäksi valaistus ja kalojen ikä helposti vakioitavissa. Lohikalat sen sijaan kasvatetaan vuodenaikojen mukaan vaihtelevissa lämpötiloissa ja valorytmissä. Ne lisääntyvät kerran vuodessa ja sukukypsyyden saavuttamiseen kuluu useita vuosia. Lohikalojen kohdalla standardien puuttuminen johtaa usein siihen, että eri tutkijoiden tulokset eivät ole vertailukelpoisia.

Seuraavassa kuvataan tarkemmin kalatesteihin liittyvää näytteenottoa edeltävää käsittelyä, näytteenottotapoja sekä näytteiden käsittelyä ja analysointia. Nämä ohjeet koskevat lähinnä subletaalivaikutusten osoittamiseksi suoritettavia myrkyllisyystestejä (1 viikko - 4 kuukautta) sekä luonnonkaloista otettavia näytteitä.

2. NÄYTTEENOTTOA EDELTÄVÄ KÄSITTELY

2.1 KALOJEN HANKINTA

Tasalaatuisimmat lohikalat saadaan koekäyttöön suurehkolta kalankasvattajalta, joka käyttää vakioituja kasvatusmenetelmiä. Tästä huolimatta kasvatuserien välillä esiintyy usein vaihtelua, joka saattaa johtua mm. altaan koosta, kasvatus-
tiheydestä, veden juoksutuksesta sekä ruokinnan määrästä ja laadusta (Hickey 1976). Mikäli kokeissa käytetään luonnonkaloja, tulee koe- ja vertailualueilta pyydystää saman lajin kaloja mahdollisimman paljon. Luonnonkalapopulaatioiden ikä ja kunto vaihtelevat suuresti, mistä johtuen tuloksissa yleensä ilmenee suuri sisäinen hajonta.

2.2 LÄMPÖTILAN JA VUODENAJAN VAIKUTUS

Iän lisäksi vuodenaajalla on suuri vaikutus kalan fysiologiseen tilaan ja tämän myötä mahdollisesti myös kalan reaktioihin myrkyllisille aineille. Erot saattavat osittain johtua myös lämpötilaeroista, koska kalojen aineenvaihdunta on erilaista lämpimässä ja kylmässä. Aikuisen kalan fysiologiaan kuuluu myös vuotuinen lisääntymiskierto, joka on voimakkaasti kytkeytyvä lämpötilan lisäksi valaistuksen määrään. Kenttäaltistukset tulisikin suorittaa sellaisena vuodenaikana, jolloin veden lämpötila on tasainen.

2.3 KULJETUS

Kuljetuksen kala kokee aina rasituksena. Vaikka lohikala kuljetettaisiin runsaassa vedessä ja kylmässä, (Solomon & Taylor 1979, Taylor & Salomon 1979), on sille ennen kokeita varattava riittävän pitkä toipumisaika. Mikäli kuljetukseen liittyy lämpötilan muutos, on toipumisaikaa syytä vielä pidentää.

Kenttäaltistuksen yhteydessä ei kuljetusrasituksesta toipumista useinkaan kyetä järjestämään. Tällöin on altistusryhmien kuljetuskäsittelyt vakioitava ja mahdolliselle laboratorio-kontrollille simuloitava vastaava rasitus (Soivio & al 1978).

Luonnonkaloja tutkittaessa rasituksen aiheuttavat puolestaan eri pyydystystavat. Koska verkkopyynti vahingoittaa kalan pintaa, tulisi koekalat pyydystää joko katiskalla tai rysällä, ja siirtää tämän jälkeen sumpuihin. Sekä koe- että kontrollikalojen käsittelyn tulee olla samanlainen.

2.4 KALOJEN SUMPUTUS YKSITELLEN

Kalan pyydystäminen altaasta tai sumpusta haavilla näytteenottoon häiritsee muita kaloja ja johtaa siten virheellisiin tuloksiin. Näytteenottohäirinnän poistamiseksi kalat tulee ennen näytteenottoa sulkea yksittäin putkisumppuihin. Tällainen sumppu on helppo valmistaa, kun kalaa n. 60 % pitempi ja halkaisijaltaan kalan suurinta läpimittaa n. 60 % suurempi polyeteeniputki suljetaan toisesta päästään havaksella. Avoimeksi jäänyt pää suljetaan kumilenkillä kiinnitetyllä havaksella. Putkisumput sijoitetaan vedessä virtauksen suuntaan, jolloin veden vaihtuminen niissä on samanlainen.

Läpinäkymättömässä putkisumputuksessa kalaa pidetään 1 - 2 vrk:n ajan liikunta-aktiivisuuden vakioimiseksi. Sumpputusaika vaikuttaa osaltaan moniin tutkittaviin suureisiin, joten se on syytä vakioida kuhunkin kokeeseen ja lämpötilaan sopivaksi.

3. NÄYTTEENOTTO TEKNIIKAT

3.1 KALAN TAINNUTTAMINEN

Näytteenottoa varten kala täytyy tainnuttaa. Käytettyjä menetelmiä ovat nukutus (jollain veteen liukenevalla kemikaalilla), lyönti päähän l. kolkkkaus tai sähkönukutus. Koska edes yleisimmin käytössä olevien nukutusaineiden vaikutusmekanismeja ei

tarkoin tunneta, tulee ensin selvittää ne tutkittaviin suu-
reisiin kohdistuvat muutokset, joita nukutusaineella mahdol-
lisesti on.

Soivio & al. 1977 suorittamien tutkimusten mukaan kolkkaami-
nen on nukutusaineiden käyttöä suositeltavampi menettely ka-
lan tainnuttamiseksi näytteenottoa varten. Hyvin pienillä ka-
loilla kolkkaaminen aiheuttaa kuitenkin kudოსvaurioita. Täl-
löin nukutus on suositeltavaa, mutta nukutusjärjestely on
ehdottomasti vakioitava (esim. MS-222 0,2 g/l 10°C). Sähkö-
nukutuksen käytöstä ei Suomessa ole tutkimustuloksia.

3.2 VERINÄYTTEENOTTOTAVAT

Yleisessä käytössä olevia verinäytteenottokohtia ovat: sydän,
ductus cuvieri sekä selkälaskimo ja -valtimo. Näistä näytteet
otetaan hepariinilla (Lagen 5000 IU Medica) käsitel-
tyyn ruiskuun. Sydänpunktio on suositeltava yli 150 g kaloja
käytettäessä. Punktio tehdään rintaevien etureunan tasossa
kohtisuoraan kalan pintaa vastaan. Ductus cuvierista saa mu-
kavasti näytteitä 50 g suuremmista kaloista. Pyrstösuoni on
ainoa mahdollinen näytteenottokohta 50 g pienemmille kaloille.
Pyrstön katkaisemista ei suositella, koska näytteeseen sekoit-
tuu tällöin helposti kudოსnestettä, mikä vaikuttaa mm. plas-
man ionipitoisuuksiin ja aiheuttaa näytteen nopean hyytymisen.
Verinäytteenottokohta vaikuttaa jossain määrin tuloksiin, jo-
ten se on aina mainittava.

Verinäytteenoton tulee tapahtua mahdollisimman nopeasti. Kos-
ka häirintä todennäköisesti kaikissa olosuhteissa aikaansaa
kalan fysiologisen tilan muuttumisen, ovat ainoastaan samalla
tavoin ja samalla ajoituksella otettujen näytteiden tulokset
vertailukelpoisia.

3.3 NÄYTTEEN KÄSITTELY

Ruiskuun saatu verinäyte on sekoitettava huolellisesti esim.
pientä ilmakuplaa apuna käyttäen. Näyte pipetoidaan tämän
jälkeen mahdollisimman nopeasti suoraan ruiskusta, sillä sy-
dänpunktiolla otetun verinäytteen punasolut turpoavat in vitro
olosuhteissa hapen osapaineen ollessa alhainen.

Suosittelavin menettely luotettavien plasmanäytteiden saami-
seksi on verinäytteen sentrifugointi välittömästi jollain no-
pealla (>8000 G) sentrifugilla. Plasma otetaan talteen ja
pakastetaan välittömästi nestetyppeen.

3.4 KUDOSNÄYTTEENOTTO

Välittömästi verinäytteenoton jälkeen otetaan kaloista kudოს-
näytteet.

Histologista rakenneanalyysiä varten kudосkappaleet (0,5 cm ϕ
kidusta, maksaa, munuaista, lihasta ja suolta) upotetaan heti
tilavuudeltaan n. 50-kertaiseen määrään fiksointinestettä
(neutraloitu 4 % formaliini, Bouin- tai glutaraldehydiliuos).
Fiksoinnilla pysäytetään solujen hajoaminen, jolloin kudosten

hienorakenne säilyy mahdollisimman samankaltaisena kuin eläväsä kudoksessa. Värjätyistä preparaateista voidaan tämän jälkeen mikroskooppisesti osoittaa tietyn tyyppisiä soluja, toiminnallisia ja rakenteellisia muutoksia tai jonkin entsyymiaktiivisuuden läsnäolo tai puuttuminen.

Fysiologisia määrityksiä varten kudoksenäytteinä otetaan tavallisesti maksaa, munuaista, lihasta sekä mahdollisesti aivot. Määrityksestä riippuen näytteet säilytetään viileässä (+4°C) tai pakastettuna välittömästi nestetyppeen.

Maksanäytettä otettaessa sappirakko ei saa rikkoontua. Maksa jaetaan niin moneen osaan kuin näytteitä tarvitaan. Samaa analyysiä varten on pyrittävä ottamaan näyte samasta kohdasta.

Munuaishäytteenä otetaan kappaleet takamunuaisesta noin 1,5 - 2 cm munuaisen takakärjestä. Tarkoituksena on ottaa yhtä suuret kappaleet kunkin kalan samasta munuaispuoliskosta samaan analyysiin.

Lihasnäyte otetaan kylkiviivan yläpuolelta selkäevän takaa. Iho ja punainen lihas leikataan pois ja näytteeksi otetaan kappale valkeaa lihasta.

Aivonäytettä otettaessa poistetaan ensin aivojen kuori, jonka jälkeen näytteinä otetaan isot ja pienet aivolohkot.

Kun kaikki tarvittavat näytteet on otettu kala punnitaan ja mitataan sekä kääritään folioon ja pakastetaan mahdollisia jäämä- ja raskasmetallimäärityksiä varten. Mikäli kaloista mitataan organosomaattinen indeksi, on punnitus hyvä tehdä heti kolkkauksen jälkeen.

3.5

KALANÄYTTEIDENOTTOSUOSITUS

Kalatestejä suoritettaessa tulee näytteenottoa edeltävä käsittely sekä itse näytteenotto pyrkiä vakioimaan seuraavasti:

- Häiriöiden välttämiseksi kalat sijoitetaan yksittäin sumppuihin (= mökki) 2 vuorokauden ajaksi ennen näytteenottoa. Mikäli kalojen kunto esim. jätevesialtistuksissa on heikko, voidaan kaloja mökittää vain 1 vuorokausi.
- Mökin tulee olla n. 60 % kalaa pitempi ja halkaisijaltaan 60 % kalan suurinta läpimittaa suurempi polyeteeniputki, joka molemmista päistään on suljettu vähintään 8 mm solmuvälillä havaksella.
- Näytteenottoon kalat otetaan mökistä yksitellen ja tainnutaan nopeasti mutta varoen. Isommat kalat tainnutetaan iskulla päähän. Pienet kalat sen sijaan voidaan nukuttaa väkiväällä MS-222-liuoksella (0,2 g MS-222/l vettä).
- Verinäyte otetaan tämän jälkeen pyrstölaskimosta heparinoituun ruiskuun.
- Neulan kantaosaan pannaan pieni kide kiinteätä hepariinia (NH₄-heparinaatti tai Na-heparinaatti) ennen ruiskun ja neulan yhdistämistä. Mikäli verinäytteen määrä on yli 0,5 ml voidaan käyttää myös nestemäistä hepariinia.

- Välittömästi näytteenoton jälkeen määritetään veren hematokriittiarvo sekä esikäsitellään hemoglobiinimääritykseen tuleva verinäyte. Loput verinäytteestä sentrifugoidaan nopeasti kiihtyvällä sentrigraduilla ($>8000\text{ G}$), plasma erotetaan punasoluista ja pakastetaan nestetyppeen.
- Kudosnäytteet otetaan tämän jälkeen myös mahdollisimman nopeasti.
- Verinäytteenottoon (kala pois vedestä \rightarrow sentrifuugi pyörii) saa kulua aikaa enintään 2 minuuttia.
- Mikäli kalan käsittelyssä tai näytteenotossa tapahtuu häiriöitä tai viivytyksiä, tulee tällainen näyte hylätä.
- Riittävän näytemäärän saamiseksi tulee tämän vuoksi mökitä ylimäärä kaloja.

Mikäli edellä mainituista ohjeista poiketaan, tulee se selvästi ilmoittaa raportoinnin yhteydessä.

4. N Ä Y T T E I D E N A N A L Y S O I N T I

4.1 VEREN HEMATOKRIITTIARVO

- määritetään sentrifugoimalla verta mikropipillaareissa hematokriittisentrifugilla 3 min. 11000 rpm.
- määrittäminen suoritettava välittömästi näytteenoton jälkeen, koska punasolut turpoavat jo muutamassa minuutissa (Soivio & al. 1973)
- tuloksena luetaan punasolupatsaan %-osuus kokoveripatsaaseen. Osoittaa punasolujen suhteen kokoverestä.

4.2 VEREN HEMOGLOBIINIPITOISUUS

- määritetään syanmethemoglobiinimenetelmällä (Sigma technical bulletin nro 525)
esim. 25 μl verta pipetoidaan 3 ml reagenssia ja sekoitetaan
- kalan veri muodostaa reagenssissa hyytymän, joka vajooa putken pohjalle seisottamalla näytepytkiä yli yön ($+4\text{ }^{\circ}\text{C}$) ja sentrifugoimalla sen jälkeen 10 min. 3000 rpm.
- näytteiden absorbanssi mitataan spektrofotometrillä aallonpituudella 540 nm. tyhjäkoetta vastaan.

4.3 VEREN JA PLASMAN GLUKOOSI- 1. SOKERIPITOISUUS

- määritetään GOD-PERID -menetelmällä (Boehringer-Mannheim), joka on todettu melko spesifiseksi glukoosin suhteen (Soivio & al. 1978). Ohutlevykromatograafisissa analyysissä ei kirjolohen veressä ole havaittu muita sokereita kuin glukoosia (Soivio & al. 1978)
- GOD-PERID -menetelmä antaa kirjolohen verellä hieman ($1,06 \times$) suurempia arvoja kuin Boehringer-Mannheimin heksokinaasimenetelmä

- lohikaloilla veren glukoosipitoisuuden sijasta on suositeltavampi määrittää plasman glukoosipitoisuus, koska punasoluissa ei ole glukoosia ja punasolujen antama absorbanssi GOD-PERID -menetelmällä on usein negatiivinen
- veri- tai plasmanäyte deproteinisoidaan näytteenoton yhteydessä 0,6 N perkloorihapolla (1:6) ja määritetään testipakauksen ohjeen mukaisesti.

GLUKOOSIN MÄÄRITYS GOD-PERID -MENETELMÄLLÄ
(menetelmä on tarkistettu kirjolohelle soveltuvaksi
Soivio et al. 1978 Pupro)

Veren glukoosin määrittäminen (Biochemica Boehringer esim. tuotenumero 124 036)

Proteiinin saostus

perkloorihappoa (0,6 mol/l) jääkylmänä 0,5 ml
veri- tai plasmanäytettä 1) 0,1 ml
sekoitetaan huolellisesti ja sentrifugoidaan

1) plasmanäytettä varten veri sentrifugoidaan (esim.
3000 g, 10 minuuttia) välittömästi näytteenoton jälkeen.

Mittaus

koeputkiin pipetoidaan:

| | tyhjäkoe | standardi | näyte |
|----------------|----------|-----------|--------|
| tislattu vesi | 0,2 ml | - | - |
| standardia | - | 0,2 ml | - |
| supernatanttia | - | - | 0,2 ml |
| reagenssia | 5,0 ml | 5,0 ml | 5,0 ml |

sekoitetaan ja inkuboidaan 20-25°C:ssa 25-50 minuuttia
sekä mitataan aallonpituudella 590 nm tyhjäkoetta vastaan
1 cm kyveteissä.

Lasku

$$\text{tulos} = 0,546 \times \frac{A_{\text{näyte}}}{A_{\text{standardi}}} \quad (\text{g/l})$$

Huom. Mikäli $A_{\text{näyte}}$ on suurempi kuin 0,8, suoritetaan määrittäminen käyttäen supernatanttia, jota on laimennettu puoleen (1+1) perkloorihapolla (0,6 mol/l).

4.4 VEREN JA KUDOKSEN LAKTAATTI- 1. MAITOHAPPOPITOISUUS

Veren laktaatti- 1. maitohappopitoisuus

- määritetään Boehringer-Mannheimin Lactate UV-testillä
- veri tai plasmanäyte deproteinisoidaan 0,6 N perkloorihapolla (1:6) ja määritetään testipakkauksen ohjeen mukaisesti
- määrittelyn tarkkuutta voidaan lisätä sekoittamalla reagenssit juuri ennen määrittystä yhteen ja pipetoimalla tätä reagenssiseosta määrittysputkiin - reagenssien määrasuhteet ovat tällöin tarkemmin vakioituneet.

Kudoksen laktaatti 1. maitohappopitoisuus

- näyte säilötään nestemäiseen tyyppiin mahdollisimman nopeasti, koska laktaattipitoisuus nousee nopeasti kudoksessa
- kudoksenäyte homogenisoidaan jauhamalla huumareella neste-mäisessä työssä
- homogenaattia punnitaan sopiva määrä (lihasnäytettä 40-80 mg) 1 ml 0,6 N perkloorihappoa sisältävään, taarat-tuun putkeen, sekoitetaan hyvin ja sentrifugoidaan
- määrittely suoritetaan supernatantista Boehringer-Mannheimin testipakkauksen ohjeen mukaan
- kudoksen lämpenemistä ja huurtumista punnitusvaiheessa on varottava.

LAKTAATIN MÄÄRITYS

(menetelmä on tarkistettu kirjolohelle soveltuvaksi
Soivio et al 1978 Pupro)

Veren ja kudosten laktaatin määrittäminen

(Biochemica Boehringer, esim. tuotenumero 124 842)

Näytteiden esikäsittely

Verinäytteistä saostetaan proteiinit jääkylmällä perkloori-hapolla heti näytteenoton yhteydessä seuraavasti

| | |
|--|--------|
| perkloorihappoa (0,6 mol/l) jääkylmänä | 0,5 ml |
| verta | 0,1 ml |

sekoitetaan hyvin ja sentrifugoidaan
supernatanttia käytetään määrittelyyn

Lihasnäyte jauhetaan nestetyypessä hienoksi, minkä jälkeen siitä punnitaan noin 40-80 mg, johon lisätään 1 ml perkloori-happoa ja sekoitetaan hyvin. Varotaan näytteen lämpiämistä punnitusvaiheessa. Näyte sentrifugoidaan ja supernatanttia käytetään määrittelyyn.

Määrittäminen

| | tyhjäkoe | näyte | standardi |
|-----------------------------|----------|---------|-----------|
| liuos 1 | 4,0 ml | 4,0 ml | 4,0 ml |
| supernatanttia | - | 0,4 ml | - |
| perkloorihappoa (0,6 mol/l) | 0,4 ml | - | - |
| liuos 2 | 0,4 ml | 0,4 ml | 0,4 ml |
| liuos 3 | 0,04 ml | 0,04 ml | 0,04 ml |
| standardi 1) | - | - | 0,4 ml |

1) tuotenumero 125 440, ohjeen mukainen laimennos.

Sekoitetaan hyvin ja inkuboidaan tasan 60 minuuttia 25°C:ssa sekä mitataan 1 cm kyveteissä ilmaa vastaan aallonpituudella 340 nm.

Lasku

$$\text{tulos} = 0,986 \times (A_{\text{näyte}} - A_{\text{tyhjäkoe}}) \text{ (g/l)}$$

4.5 MAKSAN JA LIHAKSEN GLYKOGEENIPITOISUUS

- määritetään Harris & al. 1974 kehittämän ja Soivio & al. 1978 soveltaman menetelmän mukaan
- näyte pakastetaan nestemäiseen tyypeen ja säilytetään tiiviisti suljetuissa putkissa pakastimessa tai nestetypessä. Näytteitä voidaan säilyttää vähintään 4-6 viikkoa
- näyte homogenoidaan jauhamalla huumareella nestetypessä.

GLYKOGEENIN MÄÄRITYS

Maksa- ja lihaskudoksen näytteet pakastetaan nestemäiseen tyypeen, jossa ne myös säilytetään.

Reagenssit

kaliumhydroksidiliuos 30 %
absoluuttinen etanoli
etanoli 60 %
suolahappo 1 mol/l
glukoosimääritysreagenssit (esim. Biochemica Boehringer, GOD-PERID -menetelmä tuotenumero 124 036)

Suoritus

1. Tarkoin (0,5 mg tarkkuudella) punnittu kudospääosa hydrolysoidaan noin kymmenkertaiseen määrään kaliumhydroksidiliuosta kuumentamalla kiehuavassa vesihauteessa 20 minuuttia. Eppendorf-putkessa sopiva määrä on noin 20-40 mg nestetypessä jauhettua kudosta ja 0,4 ml k-hydroksidia. Rinnalla tehtävää glykogeenistandardia varten punnitaan tarkasti noin 2-5 mg glykogeenia.

2. Hydrolysaatti tehdään absoluuttisella etanolilla 60 %:ksi etanolin suhteen, sitä pidetään sen jälkeen 5 minuuttia 60°C:ssa ja sentrifugoidaan 30 minuuttia (4000 g) tai 2 minuuttia (13000 g).
3. Supernatantti poistetaan tarkoin ja sakkaa (glykogeenia) pestään lisäämällä yhtä suuri määrä 60 % etanolia ja sekoittamalla hyvin. Pesua jatketaan kuten kohdassa 2 neuvotaan. Tämä toistetaan kolme kertaa.
4. Supernatantti poistetaan tarkoin ja glykogeeni hydrolysoidaan suolahapolla 1 mol HCl/l. Suolahappoa käytetään kymmenen kertaa alkuperäisen lihaskudoksen määrä ja 20 kertaa maksakudoksen määrä. Tarkoin suljettuja putkia kuumennetaan kiehuvalle vesihautteelle 2 tuntia.
5. Määritetään glykogeenihydrolysaatin glukoosipitoisuus. Lihaksesta valmistettua hydrolysaattia ei tarvitse laimentaa ja sitä käytetään kuin verinäytteen deproteinoitua supernatanttia. Maksanäytteitä täytyy laimentaa (1+9) glukoosimääritystä varten.

Lasku

$$\text{tulos} = 81 \times V/m \times \frac{A_{\text{näyte}}}{A_{\text{standardi}}} \text{ (g/kg)} = \text{glykogeenin määrä}$$

V = suolahapon määrä millilitroina. (Maksamäärityksessä tulee tulos kertoa vielä laimennuskertoimella).

m = kudoksen massa milligrammoina.

A standardi = GOD-PERID-testipakkauksen standardin absorbanssi. Yhden glukosyyliyksikön kaavapainoksi on otettu 162. Standardin glukoosipitoisuus on GOD-PERID -menetelmän mukainen.

4.6 PLASMAN JA LIHAKSEN KOKONAISLIPIDIPITOISUUS

- plasman kokonaislipidit määritetään Boehringer-Mannheimin Total Lipids -menetelmällä testipakkauksen ohjeen mukaisesti
- määritettäessä totaalilipidit lihaksesta noin 50 mg lihasta punnitaan tarkoin. Homogenointi ei ole välttämätön
- määrittämisen tarkistamiseksi kirjolohen lihaksen rasvapitoisuus on määritetty sekä suoraan em. menetelmällä että eristämällä rasva ennen määrittämistä kloroformi-metanoliuutolla; eri menetelmillä saadut tulokset eivät eronneet merkittävästi toisistaan.

KOKONAISLIPIDIEN MÄÄRITYS

Boehringer-Mannheimin kolorimetrinen menetelmä
(esim. tuotenumero 124 303)

Määrittäminen suoritetaan testipakkauksen ohjeen mukaan seerumista tai heparinoidusta plasmasta 20°C:ssa 1 cm kyvetissä aallonpituudella 530 nm.

Määrittäminen

koeputkiin pipetoidaan

| | tyhjäkoe | standardi | näyte |
|---------------------|----------|-----------|---------|
| liuos 1 (standardi) | - | 0,05 ml | - |
| näyte | - | - | 0,05 ml |
| rikkihappoa | - | 2,00 ml | 2,00 ml |

Sekoitetaan ja suljetaan putki vanulla tai selstöffilla. Inkuboidaan 10 minuuttia kiehuavassa vesihauteessa. Jäähdytetään ja pipetoidaan uusiin koeputkiin:

| | | | |
|-------------------------|---------|---------|---------|
| em. liuosta | - | 0,10 ml | 0,10 ml |
| rikkihappoa | 0,10 ml | - | - |
| liuos 2 (värireagenssi) | 2,50 ml | 2,50 ml | 2,50 ml |

Sekoitetaan ja annetaan seistä 20-25°C:ssa 30 minuuttia. Liuos siirretään kuiviin kyvetteihin ja luetaan absorbanssi. Mitataan $A_{\text{(näyte)}}$ ja $A_{\text{(standardi)}}$ tyhjäkoetta vastaan 30 minuutin kuluessa.

$$\text{Seerumin lipidit } C \text{ (g/l)} = 10 \times \frac{A_{\text{näyte}}}{A_{\text{standardi}}}$$

4.7

PLASMAN JA KUDOKSEN PROTEIINIPITOISUUS

- plasman ja kudoksen proteiinipitoisuus määritetään joko Biuret-, Kjeldahl- tai Lowryn et. al. menetelmällä
- Kjeldahl -menetelmässä mitataan näytteen sisältämän orgaanisen ja ammoniumtypen määrä, biuret-reaktio tapahtuu pääasiassa peptidi-sidosten kanssa ja Lowryn menetelmässä reagoivat Cu-proteiinikompleksi sekä tyrosiini ja tryptofaani. Eri menetelmillä saadut arvot voivat siten poiketa toisistaan huomattavasti johtuen proteiinien animohappokoostumuksesta
- Cannon ym. 1974 mukaan Kjeldahl ja Biuret -menetelmät antavat ihmisen seerumilla melko hyvin vastaavat arvot
- Biuret -menetelmä soveltuu hyvin plasman proteiinin määrittämiseen
- Kjeldahlin ja Lowryn menetelmät soveltuvat kudosproteiinien määrittämiseen. Lowryn menetelmä on erittäin herkkä soveltuen siten pienten kudospitoisuuksien ja laimeiden kudoshomogenaattien määrittämiseen. Lowryn menetelmää käytetään usein entsyymiaktiivisuusmäärittysten yhteydessä
- Kjeldahlin menetelmä on suositeltava kudosproteiinin määrittämismenetelmä mm. typpitasemittauksissa, mikäli näytettä on runsaasti käytettävissä.

PROTEIINIMÄÄRITYS (Lowry)

Kudokset homogenoidaan 5-10 kertaiseen puskurimäärään, jonka jälkeen näytteet laimennetaan seuraavasti:

Mitokondriosupernatantti 1:50 (100 μ l supern. + 4,9 ml pus-
kuria)
Kudoshomogenaatti: 1:100 (50 μ g + 4950 μ l puskuria)
Mikrosomit: 1:100
Plasma: 1:100

Määrittäminen

Laim. näyte 0,5 ml (tyhjäkoe-putkeen pipetoidaan 0,5 ml pusku-
NaOH 0,25 ml)

Putkia inkuboidaan 60°C vesihauteessa 90 minuuttia.
Putkien jäähtyttyä niihin lisätään

Reagenssi C 2,5 ja sekoitetaan huolella ja
seisotetaan huoneenlämmössä pimeässä 10 minuuttia.
Reagenssi E 0,25 ja sekoitetaan huolella ja
seisotetaan huoneenlämmössä pimeässä 30 minuuttia.

Absorbanssi mitataan aallonpituudella 555 nm tyhjäkoetta vas-
taan. Hydrolyysin jälkeen putkia voidaan seisottaa. Jokaisessa
määrittäyksessä on mukana standardiputki, johon pipetoidaan
standardiliuosta 0,5 ml ja käsitellään kuten edellä.

Reagenssit

| | |
|-----------------------------------|--|
| 0,3 N NaOH | 6 g/500 ml aq. dest. |
| Reag. C = 1 ml A + 50 ml B | valmistetaan päivittäin. |
| A | 0,1 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ /20 ml 1 % Na-K-tartraatti. |
| B (2 % Na_2CO_3) | 10 g Na_2CO_3 /500 ml H_2O |
| 1 % Na-K-tartraatti | 5 g/500 ml aq. dest. |
| E (Folin-reagenssi) | 1 osa kaupall. valm. + 2 osaa vettä (valmistetaan päivittäin) |
| Standardi (albumiini esim.) | 25 mg 50 ml aq. dest. |

Liuokset säilytetään jääkaapissa paitsi NaOH.

4.8 PLASMAN JA KUDOKSEN IONIPITOISUUDET

- plasma laimennetaan suoraan määrittäksiä varten.

Uutto kudoksista (Lönn, julkaisematon)

- ravistellaan kudospätkää 48 h 10 kertaissa määrässä
0,3 N typpihappoa; pienen kudospätkän (\leq n 1 g) homogenointi
ei tarpeellinen
- sentrifugoidaan uuton jälkeen 4000 g 10 minuuttia, ja mää-
ritetään supernatantista ionit jäljempänä olevien ohjeiden
mukaisesti
- yhdenarvoiset ionit uuttuvat varsin kvantitatiivisesti;
mutta osa kahdenarvoisista (Ca^{2+} , Mg^{2+}) jää proteiiniin si-
toutuneena sakkaan; uuttoaikaa pidentämällä tai typpihapon
väkevyyttä lisäämällä ei uuttumistehokkuus kuitenkaan mer-
kitsevästi parane.

Määritykset

a) Na^+ ja K^+

- määritetään liekkifotometrisesti
- plasma laimennetaan tuplatislattulla vedellä 1:50 K^+ -määritystä varten, ja tästä edelleen 1:20 Na^+ -määritystä varten
- kudoksenäyte laimennetaan ionipitoisuuksista riippuen siten, että näytteen K^+ -pitoisuus on n. 0,05-0,1 mmol/l ja Na^+ -pitoisuus 0,1-0,15 mmol/l

b) Cl^-

- määritetään kloridititraattorilla suoraan plasmasta tai uutetusta kudoksenäytteestä

c) Mg^{2+} ja Ca^{2+}

- määritetään atomiabsorptiospektrofotometrisesti tai kolorimetrisesti WAKO -testipakkauksilla (Mg-test ja Ca-test)
- em. menetelmät antavat ihmisen kontrolliseerumilla hieman toisistaan poikkeavat arvot (Mg^{2+} 7 % korkeampi ja Ca^{2+} 5 % alhaisempi WAKO -menetelmällä AAS:iin verrattuna)
- erot johtunevat proteiiniin sitoutuneiden ionien antamasta erilaisesta vasteesta määrityksissä
- määrittäminen WAKO:n testipakkauksilla suoritetaan ohjeen mukaisesti; vahvasti hemolysoitunut plasma antaa virheellisen tuloksen
- määrittäminen AAS:illa; plasmanäyte laimennetaan 0,1 % lantaaniliuoksella (lantaanioksidi tai lantaanikloridi) 1:100 (Ca^{2+} -pitoisuus laimennoksessa n. 1 ppm ja Mg^{2+} -pitoisuus n. 0,25 ppm). Kudoksenäyte laimennetaan vastaavasti samalle pitoisuusalueelle. Titrisol-varastostandardista, joka sisältää Ca^{2+} 100 mg/l ja Mg^{2+} 20 mg/l, tehdään laimennokset 1/200, 1/100, 1/50 ja 1/25 0,1 % lantaaniin. Määritetään standardisuora, ja luetaan siltä näytteiden lukemaa vastaavat pitoisuudet.

4.9

KUDOKSEN VESIPITOISUUS

- määrittäminen tehdään kuivattamalla kudoksenäyte 105°C:ssa vakio-painoon; pienillä kudokseleilla kuivatusaika on 24-36 h
- tuorepaino punnitaan välittömästi näytteenoton yhteydessä suljetuissa, tiiviissä näyteputkissa, varottava veden haihtumista kudoksesta näytteenoton yhteydessä
- mikäli punnitusta ei voida tehdä välittömästi, säilötään näytteet mieluiten suljetuissa putkissa nestemäiseen tyypeen; punnitusvaiheessa varottava näytteiden huurtumista
- kuivatuksen jälkeen näytteet siirretään eksikaattoriin jäähtymään ja punnitaan
- vesipitoisuus (%) = $100 \times \frac{\text{kuivap.}}{\text{tuorep.}}$

ENTSYYMIMÄÄRITYKSET

Helsingin Yliopiston, Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitoksen sekä maa- ja metsätalousministeriön keskeinen tutkimusprojekti on tarkistanut osan seuraavista kliinisessä käytössä olevista entsyymimääritysmenetelmistä kirjolohelle soveltuvaksi.

4.10 LAKTAATTIDEHYDROGENAASI AKTIIVISUUS (LDH) (Oikari et al. 1978a)

- menetelmä Wroblewski & LaDue (1955), joka on pohjana nykyisin käytössä olevalle kliiniselle menetelmälle (Z.Klin.Chem.Klin.Biochem. 10:281-291, 1972)
- näytteen LDH-aktiivisuuden säilyvyys: homogenaattina säilyy huoneenlämmössä muutaman tunnin, 2-4°C:ssa 4 vrk ja -20°C:ssa ainakin kuukauden; kudospale säilyy -20°C:ssa ainakin 2 kk.

LDH-AKTIIVISUUDEN MÄÄRITYS (kirjolohi)

NADH:n hapettuessa seurataan absorbanssin pienenemistä 340 nm aallonpituudella, 25°C:n lämpötilassa ja 1 cm kyvettä käyttäen.

Määritys voidaan tehdä sekä plasmasta että kudossupernatantista, joka on valmistettu seuraavasti:

- kudospaleet (50-500 mg punnittuna tarkasti) huuhdellaan kertaalleen nopeasti 0,013 mol/l jääkylmällä Na-fosfaattipuskurilla (pH 7,0). Mikäli näyte on jäädytetty, annetaan sen sulaa jääkaappilämpötilassa (n. +4°C)
- lihasnäytteet homogenisoidaan 10-kertaisessa tilavuudessa (mitattuna tarkasti) em. puskuria ensin 10 sek. ajan Ultra-Turrax-(Janke & Kunkel KG) ja sitten suorittaen 15 ylösalas -vaihetta Potter-Elvehjelm (Thoma, lasiteflon) -homogenisaattorilla. Pehmeämmät kudokset (esim. maksa, munuainen, sydän) homogenisoidaan suoraan Potter-Elvehjelm-laitteella 10-20 -kertaiseen tilavuuteen (tarkasti mitattuna) puskuria. Homogenisoitaessa näytettä jäädytetään jäähauteessa
- homogenaattia sentrifugoidaan 30 minuuttia 22000 g 4°C:n lämpötilassa. Supernatanttia käytetään aktiivisuuseritykseen.

Näyte (plasma tai supernatantti) laimennetaan juuri ennen määrittystä 0,9 % NaCl-liuoksella niin, että $\Delta A/\text{min.}$ on 0,010-0,080; kirjolohella sopivat laimennokset ovat esim. plasma 1:2-1:10, lihas 1:50-1:200 (kokonaislaimennus 1:500-1:2000), sydän 1:20-1:50 (1:200-1:1000) ja maksa 1:200-1:500 (1:2000-1:10000).

Suoritus

- fotometri nollataan ilmaa tai tislattua vettä vastaan
- tarkistetaan 0,1 mmol/l NADH-puskuri -liuoksen absorbanssi, joka tulee olla n. 0,500
- 3,0 ml puskuri-substraattiliuosta pipetoidaan esim. Wassermann-putkeen (25°C), ja tähän lisätään sekoittaen
- 50 µl NADH-liuosta ja
- 100 µl laimennettua näytettä. Seos kaadetaan nopeasti kyvettiin ja lähtöabsorbanssi luetaan mahdollisimman pian. Minuutin välein, kolmen minuutin ajan, luetaan absorbanssit ja lasketaan $\Delta A/\text{min.}$ (keskiarvo).

Aktiivisuus määritetään kahdesti, jolloin niiden ero tulee olla alle 10 %. Rinnakkaismääritysten keskiarvoa käytetään seuraavissa laskutoimituksissa:

Laskut

Näytteen aktiivisuus: $5000 \times \Delta A/\text{min.} = U/l$

Aktiivisuus proteiinimäärää kohti:

$$\frac{U/l}{\text{mg prot.}/l} = U/\text{mg prot.}$$

Plasman tai supernatantin proteiinipitoisuus määritetään Lowry ym. (1951) mukaan.

Aktiivisuus kudoksen tuorepainoa kohti:

$$5000 \times \Delta A/\text{min.} \times \frac{V}{m} = U/g \text{ tuorep.}$$

missä V = laimennospuskuria l, ja m = kudoksen tuorepaino g.

Reagenssit

1. Puskuri-substraatti (pH 7,0; 1,2 mmol/l Na-pyruvaatti)
säilyy jääkaapissa 1 kk)
 - 0,05 mol/l fosfaattipuskuri
liuos A: 11,412 g K_2HPO_4 tisl. vedellä 1000 ml:ksi
liuos B: 6,805 g KH_2PO_4 " " "
pH 7,0: 100 ml A + 73 ml B (säilytetään jääkaapissa)
 - 13,2 mg Na-pyruvaattia/100 ml puskuria
2. NADH-liuos (6,3 mmol/l, tehdään päivittäin)
 - 4,469 mg NADH/ml tislattua vettä
(NADH: dinatriumsuola, grad II, Boehringer No 128 015).

Pitoisuudet reaktioseoksessa

| | |
|------------|-----------------------|
| Pyruvaatti | 1,2 mmol/l |
| NADH | 0,1 mmol/l |
| Puskuri | 50 mmol/l K-fosfaatti |
| pH | 7,0 |

LDH:N H/M -SUHTEEN MÄÄRITYS ERI PYRUVAATTIPITOISUUKSILLA
(kirjolohi)

Suoritus

- liitteessä 1 kuvatulla tavalla määritetään LDH:n aktiivisuus kahdella eri substraattipitoisuudella:
0,06 mmol/l ja 6,0 mmol/l Na-pyruvaatti (pH 7,0).

Laskut

$$\frac{\text{aktiivisuus } 0,6 \text{ mmol/l pyruvaatti}}{\text{aktiivisuus } 6,0 \text{ mmol/l pyruvaatti}} = \text{H/M suhde}$$

Reagenssit

1. Puskuri-substraatit (pH 7,0, 0,6 ja 6,0 mmol/l Na-pyruvaatti, säilyy jääkaapissa 1 kk)
 - 0,05 mol/l fosfaattipuskuri
katso liite 1
 - Na-pyruvaatit
 - I. 0,6 mmol/l: 6,6 mg Na-pyruvaattia/100 ml puskuria
 - II. 6,0 mmol/l: 66,0 mg Na-pyruvaattia/100 ml puskuria
2. NADH-liuos (6,3 mmol/l, tehdään päivittäin)
katso liite 1

LAKTAATTIDEHYDROGENAASIN (LDH) MÄÄRITYS
Boehringer-Mannheimin LDH opt. UV-menetelmällä
(esim. tuotenumero 124 893)

Määritetään testipakkauksen ohjeen mukaan seerumista tai heparinoidusta plasmasta 25°C:ssa 1 cm kyvetissä ilmaa vastaan aallonpituudella 340 nm.

Mittaus

Koeputkiin pipetoidaan

| | |
|--|---------|
| liuos 1 (fosfaattipuskuri/substraatti) | 3,00 ml |
| liuos 2 (NADH) | 0,05 ml |
| näyte | 0,10 ml |

Sekoitetaan näytteen lisäyksen jälkeen ja luetaan absorbanssi 30 sekunnin sisällä ja tästä tarkasti 1, 2 ja 3 minuutin välein. Lasketaan absorbanssin keskimääräinen muutos minuutissa ($\Delta A/\text{min.}$) ja käytetään tätä laskutoimituksessa.

LDH aktiivisuus = $U/1$ (25°C) = $5000 \times \Delta A_{340 \text{ nm}}/\text{min.}$

4.11

KOLIINIESTERAASIAKTIIVISUUS

(Oikari et al. 1978b)

- aivo- ja lihasnäytteistä sekä ilmeisesti myös muista kudostenäytteistä, mutta ei plasmasta, määritetään Augustinssonin (1957) tarkistamalla Hestrinin menetelmällä
- plasma- ja aivonäytteistä määritetään Weberin (1966) tarkistamalla Ellmanin menetelmällä
- näytteen koliiniesteraasiaktiivisuuden säilyvyys: säilytettäessä kudoksenäytettä tai homogenaattia 1-4 vrk 4°C :ssa, -20°C :ssa tai nestemäisessä tyypessä sen koliiniesteraasiaktiivisuus kasvaa jonkin verran (10-40 %), siten säilytysaika vakioitava
- suositus: säilytys 1 vrk jääkaapissa, pitemmät ajat nestemäisessä tyypessä.

KOLIINIESTERAASIAKTIIVISUUDEN MÄÄRITYS HESTRININ MENETELMÄLLÄ (kirjolohi)

Määrittäminen voidaan tehdä esim. aivo- tai lihashomogenaatista (ei plasmasta), joka on valmistettu seuraavasti:

- Kudokskappaleet (50-300 mg punnittuna tarkasti) huuhdellaan kertaalleen nopeasti 1 % NaCl-liuoksella (4°C). Mikäli kudospala on jäädytetty, annetaan sen sulaa jääkaappilämpötilassa (n. 4°C).
- Kudokskappaleet homogenisoidaan suorittaen Potter-Elvehjelm (Thomas, lasi-teflon) -homogenisaattorilla 15 ylös-alas -vaihetta (3000 rpm) - 5-kertaisessa tilavuudessa (mitattuna tarkasti) tislattua vettä tai 0,1 mol/l Na-barbitaalipuskuria (pH 8,6). Homogenisoitaessa näytettä jäähdytetään jäähäuteessa.

Näyte (= homogenaatti) laimennetaan juuri ennen määrittäystä 1 % NaCl-liuoksella niin, että aivohomogenaatin arvioitu proteiinipitoisuus inkubaatioseoksessa on alueella 0,25-1,0 mg/ml (sopiva homogenaatin laimennus 1:10-1:50, kudoksen kokonaislaimennus (1:50-1:250) ja lihashomogenaatin 0,1-2,0 mg/ml (homogenaatin laimennus 1:2-1:20, kokonaislaimennus 1:10-1:100)).

Suoritus

Kullakin näytteellä on oma näytetyhjäkoe ja näytesarjalla yksi reagenssityhjäkoe.

Pipetointikaavio:

| | Näyte ml | Tyhjäkoe (näyte) ml | Tyhjäkoe (reagenssi) ml | |
|-----------------------------|-------------|---------------------------|-------------------------------|--------------------|
| näyte | 0,05 | 0,05 | - | |
| barbitaalipuskuri | - | - | 1,0 | |
| alk.hydroksyyli- amiini | - | 2,0 | 2,0 | vesi- hauteella |
| barbitaalipuskuri+ AChCl | 0,95 | 0,95 | - | |

Inkuboidaan 15 min. 25°C:ssa

| | | | |
|-----------------------------------|------|------|------|
| Alkaalinen hyd- roksyyliamiini | 2,00 | - | - |
| HCl (1:3) | 1,00 | 1,00 | 1,00 |
| FeCl ₃ (5 %) | 1,00 | 1,00 | 1,00 |

Sentrifugoidaan 5 min. 2000 g

Mittaus

Fotometri nollataan reagenssityhjäkoetta vastaan aallonpituudella 540 nm. Absorbanssi mitataan supernatantista käyttäen 10 mm:n kyvettiä.

Huom. Kunkin reagenssin lisäämisen jälkeen on putkia ravis-
teltava huolellisesti. HCl:n ja FeCl₃:n lisäysten välin tulee
olla ainakin 1 min. Absorbanssi on mitattava 15 min:n kulues-
sa FeCl₃:n lisäämisestä.

Määrittäyksessä voidaan hydroksyyliamiinin lisäämisen jälkeen
pitää tauko (esim. 15-20 min.).

Laskut

$$\text{Homogenaatin aktiivisuus: } \frac{10989 \times \Delta A \times \text{laim.kerroin}}{15} = U/l$$

$$\Delta A = A_{\text{näytetyhjäkoe}} - A_{\text{koe}}$$

Aktiivisuus proteiininimäärää kohti:

$$\frac{U/l}{\text{mg prot./l}} = U/\text{mg prot.}$$

Homogenaatin proteiinipitoisuus määritetään Lowry ym. (1951,
J.Biol.Chem. 193: 265-275) mukaan.

Aktiivisuus kudoksen tuorepainoa kohti:

$$U/l \times \frac{V}{m} = U/g \text{ tuorep.}$$

missä V = homogenisointitilavuus (= puskuri + kudokset, 1 g=1 ml) l
ja m = kudoksen tuorepaino g

Reagenssit

1. Barbitaalipuskuri (0,05 mol/l, pH 8,6, säilytetään jääkaapissa)
liuos A: 10,31 g Na-barbitaalia tisl. vedellä 1000 ml:ksi
liuos B: 4,10 ml väk. HCl tisl. vedellä 1000 ml:ksi
pH 8,6: 431 ml A + 69 ml B.
2. AChCl-kantaliuos (0,04 mol/l, voidaan säilyttää jääkaapissa n. viikon ajan tai pakastettuna kertakäyttöeriin)
0,7268 g asetyylikoliinikloridia tisl. vedellä 100 ml:ksi,
pH säädetään 4,0:ksi muutamalla tipalla 0,1 mol/l HCl.
3. Barbitaalipuskuri + AChCl (0,004 mol/l AChCl, valmistetaan päivittäin.
AChCl-kantaliuosta laimennetaan 1:10 barbitaalipuskurilla.
4. Hydroksyyliamiini (2 mol/l, säilytetään jääkaapissa)
13,898 g hydroksyyliamiinia tisl. vedellä 100 ml:ksi.
5. Natriumhydroksidi (3,5 mol/l, säilytetään huoneenlämmössä)
14,0 g NaOH tisl. vedellä 100 ml:ksi.
6. Alkaalinen hydroksyyliamiini (1 mol/l hydroksyyliamiini, valmistetaan päivittäin)
1 osa natriumhydroksidi- + 1 osa hydroksyyliamiiniliuosta.
7. HCl (1:3) (säilytetään huoneenlämmössä)
1 osa väk. HCl + 2 osaa tisl. vettä.
8. FeCl_3 (5 %, 0,185 mol/l, säilytetään huoneenlämmössä)
12,5 g FeCl_3 250 ml:ksi 0,1 mol/l HCl:lla.

Pitoisuudet

Entsyymireaktiossa

AChCl 3,8 mmol/l
Puskuri 50 mmol/l Na-barbitaali
pH 8,6

Värireaktiossa

Hydroksyyliamiini 400 mmol/l
 FeCl_3 37 mmol/l

KOLIINIESTERAASIAKTIIVISUUDEN MÄÄRITYS ELLMANIN MENETELMÄLLÄ (kirjolohi)

Määritys voidaan tehdä aivohomogenaatista, joka on valmistettu seuraavasti:

- Kudokskappaleet (50-100 mg punnittuna tarkasti) huuhdellaan kertaalleen nopeasti 1 % NaCl-liuoksella (4°C). Mikäli kudospala on jäädytetty, annetaan sen sulaa jääkaappilämpötilassa (n. 4°C).
- Kudokskappaleet homogenisoidaan - suorittaen Potter-Elvehjelm (Thomas, lasi-teflon) -homogenisaattorilla 15 ylös-alas -vaihetta (3000 rpm) - 5-kertaisessa tilavuudessa (mitattuna tarkasti) tislattua vettä tai 0,1 mol/l Na-barbitaali-puskuria (pH 8,6). Homogenisoitaessa näytettä jäähdytetään jäähauteessa.

Suoritus

Fotometri nollataan ilmaa tai puskuria vastaan aallonpituudella 405 nm.

Pipetointikaavio

| | | |
|------------------------|------------------------|--------------|
| Tris-DTNB -puskuri | 1 ml | |
| Näyte (homogenaatti) | 20 μl | kyvettiin |
| Sekoitetaan, lämpötila | 20°C , | lisätään |
| AChSJ (25 mmol/l) | 50 μl | sekoitetaan. |

Mittaus

Välittömästi substraatin lisäämisen jälkeen mitataan aika, joka kuluu 0,100 absorbanssiyksikön lisäykseen. Reaktion lineaarisella alueella (n. 75 sek.) mitataan 2-3 jaksoa, ja tulosten keskiarvoa käytetään aktiivisuuden laskemisessa.

Huom. Mikäli aktiivisuus on pieni, voidaan mitata 0,050 absorbanssiyksikön muuttumiseen kuluva aika. Myös substraattiliuoksen lämpötilan on oltava 20°C .

Plasman ChE mitataan käyttäen K-fosfaattipuskuria (50 mmol/l, pH 8,0) ja vakioitua näytetilavuutta (25 tai 50 μl) tai laimennusta.

Laskut

$$\text{Homogenaatin aktiivisuus: } \frac{V_{\text{tot}} \times 0,1 \times 60 \times \text{laim.kerroin}}{V_s \times 0,0133 \times s} = U/l$$

V_{tot} = seoksen kokonaistilavuus (1,070 ml)
 V_s = näytetilavuus (0,020 ml)
 s = 0,100 absorbanssiyksikön muutokseen kulunut aika sekunteina.

Glutathionin molaarinen absorptiviteetti on $13,3 \text{ cm}^2/\mu\text{mol} \times 10^{-1}$
 Aktiivisuus proteiinimäärää kohti:

$$\frac{U/l}{\text{mg prot.}/l} = U/\text{mg prot.}$$

Homogenaatin proteiinipitoisuus määritetään Lowry ym. (1951, J.Biol.Chem. 193: 265-275) mukaan, plasman proteiinipitoisuus voidaan mitata myös biuret -reaktiolla (Saris, N-E. 1972: Kliiniset laboratoriotutkimukset, WSOY).

Reagenssit

1. Tris-HCl -puskuri (0,05 mol/l, pH 8,6, säilytetään jääkaapissa)
 3,03 g Tris tisl. vedellä 500 ml:ksi, pH säädetään
 1 mol/l HCl:lla 8,6:ksi.
 1 mol/l HCl = 16,6 ml väk. HCl laimennetaan tisl. vedellä
 200 ml:ksi.
2. K-fosfaattipuskuri (0,05 mol/l, pH 8,0, säilytetään jääkaapissa)
 liuos A: 11,412 g K_2HPO_4 tisl. vedellä 1000 ml:ksi
 liuos B: 6,805 g KH_2PO_4 tisl. vedellä 1000 ml:ksi
 pH 8,0: 481,5 ml A + 18,5 ml B.
3. AChSJ (25 mmol/l, tehdään päivittäin - voidaan myös pakastaa kertakäyttöeriin)
 72,3 mg asetyyliitiokoliinijodidia tisl. vedellä 10 ml:ksi.
4. Tris-DTNB -puskuri (säilyy jääkaapissa 1 kk)
 20 mg 5,5-ditiobis(nitrobensoe)happo (= DTNB 200 ml:ksi)
 Tris-HCl- tai K-fosfaattipuskurilla.

Pitoisuudet reaktioseoksessa

| | |
|---------|--|
| AChSJ | 1,2 mmol/l |
| DTNB | 0,25 mmol/l |
| Puskuri | 50 mmol/l Tris-HCl (pH 8,6) tai 50 mmol/l K-fosfaatti (pH 8,0). |

KOLINESTERAASIAKTIIVISUUDEN MÄÄRITYS

Boehringer-Mannheimin kolorometrisella menetelmällä
 (esim. tuotenumero 124 133)

Määrittäminen suoritetaan seerumista tai heparinoidusta plasmasta
 25°C :ssa 1 cm kyvetissä ilmaa vastaan aallonpituudella 405 nm.

Määrittäminen

koeputkiin pipetoidaan

| | |
|------------------------------|---------|
| liuos 1 (puskuri/kromogeeni) | 3,00 ml |
| näyte | 0,02 ml |
| liuos 2 (substraatti) | 0,10 ml |

Sekoitetaan ja luetaan absorbanssi välittömästi. Tämän jälkeen mitataan aika sekunneissa, joka tarvitaan absorbanssin muutokseen 0,100 yksiköllä ($\Delta A = 0,100$)

$$\text{kolinesteraasiaktiivisuus U/l} = \frac{70376}{\text{aika sekunneissa (t)}}$$

4.12 ASPARTAATTIAMINOTRANSFERAASI AKTIIVISUUS (ASAT) (Vuorinen et al. 1978)

- menetelmä Karmen (1955), joka pohjana Biochemica Boehringer GmbH:n testipakkauksessa

ASPARTAATTIAMINOTRANSFERAASI AKTIIVISUUDEN (ASAT, l. GOT) SPEKTROFOTOMETRINEN MÄÄRITYS

Yleistä

Määritysohje sopii ainakin taimenen ja kirjolohen kudosten ASAT-määrittelyksiin. Näytteenä voi olla heparinisoituun ruiskuun imetystä verestä erotettu plasma tai kudoshomogenaatti. Jääkaapissa näytteet säilyvät neljä tuntia, tavallisessa pakastimessa ainakin viikon ja nestetyypessä vähintään kaksi viikkoa.

Näytteen valmistus

- kuduskappaleet punnitaan tarkasti
- kuduskappaleet homogenisoidaan - suorittaen Potter-Elvehjelm-homogenisaattorilla (Thomas, lasi-teflon) 15 ylös-alas -vaihetta (3000 kierrosta/min.) - 5-kertaisessa tilavuudessa (mitattava tarkasti) jääkylmää tislattua vettä. Homogenisointaessa näytettä jäähdytetään jäähauteessa
- homogenaatti tehdään 0,5-prosenttiseksi detergentin (Triton X-100) suhteen, ja sen annetaan vaikuttaa 15 minuuttia; putkea pidetään jäähauteessa.

Plasma tai kudoshomogenaatti laimennetaan juuri ennen määrittelyä 1-% NaCl:lla siten, että mitattaessa aallonpituudella 340 nm absorbanssi muuttuu 0,01-0,1 yksikköä minuutissa. Sopiva homogenaatin kokonaislaimennus on 1:20-1:50 ja plasman 1:5-1:10.

Reagenssit

1. Fosfaattipuskuri 0,1 mol/l, pH 7,4 (9,663 g KH_2PO_4 , 5,156 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ / l tisl. vettä, säilytetään jääkaapissa)
2. L-asparagiinihappoliuos 0,64 mol/l (85,184 g/l tisl. vettä, säilytetään jääkaapissa)
3. α -ketoglutaraaattiliuos 0,06 mol/l (9,350 g/tisl. vettä, säilytetään jääkaapissa)

4. NADH (= nikotiiniamidiadeniiniidinukleotidi)-liuos 6 mmol/l (4,540 g NADH-Na₂/tisl. vettä, tehdään päivittäin)
5. MDH (= malaattidehydrogenaasi)-liuos 600 U/ml, Boehringer n:o 127 892, laimennetaan 50 %:sella glyserolilla, säilytetään jääkaapissa)
6. NaCl (= natriumkloridi)-liuos 1 %:nen
7. K₂Cr₂O₇ (= kaliumdikromaatti)-liuos 0,1 mmol/l (294 mg K₂Cr₂O₇ /l tisl. vettä; käyttöliuos saadaan tästä laimennamalla 1/70 tisl. vedellä).

Suoritus

Mittaus aallonpituudella 340 nm kyvetissä, jonka valotien pituus on 1 cm, ilmaa tai 0,1 mmol/l K₂Cr₂O₇-liuosta vastaan; lämpötila 25°C.

Pipetoidaan

- 2,30 ml fosfaattipuskuria
- 0,35 ml L-asparagiinihappoliuosta
- 0,05 ml NADH-liuosta
- 0,05 ml MDH-liuosta
- 0,20 ml näytettä

Inkuboidaan 25°C:n vesihauteessa 15 min.

Lisätään 0,25 ml α-ketoglutaratiliuosta.

Sekoitetaan.

Otetaan välittömästi nollalukema, ja sen jälkeen lukema 1, 2 ja 3 minuutin kuluttua.

Näytteen proteiinipitoisuus määritetään Lowry:n ym. (1951, J.Biol.Chem. 193: 265-275) menetelmällä; plasmasta sellaiseen ja kudoksenäytteestä homogenaatista.

Tulosten laskeminen

Homogenaatin aktiivisuus:

$$U/l = 2540 \times \Delta A/\text{min.} \times \text{laim.kerr.}$$

(jolloin laim.kerr. = homogenaatin laimennus määrittystä varten)

Aktiivisuus kudoksessa proteiinimäärää kohti:

$$U/\text{mg prot.} = \frac{U/l}{\text{mg prot.}/l} \times 5$$

Aktiivisuus kudoksessa tuorepainoa kohti:

$$U/g = 2540 \times \Delta A/\text{min.} \times \text{laim.kerr.} \times \frac{V}{m}$$

missä V = homogenisointitilavuus l (puskuri + pudos, 1 g=1 ml)
m = kudoksen tuorepaino g

Pitoisuudet reaktioseoksessa

| | |
|--------------------------|-----------|
| puskuri | 72 mmol/l |
| L-asparagiinihappo | 70 " |
| α -ketoglutaratti | 5 " |
| NADH | 0,1 " |
| MDH | 9300 U/l |

ASPARTAATTIAMINOTRANSFERAASI AKTIIVISUUS (ASAT 1. GOT)
Boehringer-Mannheimin UV-menetelmällä
(esim. tuotenumero 124 478)

Määritetään testipakkauksen ohjeen mukaan seerumista tai heparinoidusta plasmasta 25°C:ssa 1 cm kyvetissä ilmaa vastaan aallonpituudella 340 nm.

Mittaus

koeputkiin pipetoidaan

| | |
|--|---------|
| liuos 1 (fosfaattipuskuri/substraatti) | 3,00 ml |
| liuos 2 (NADH) | 0,05 ml |
| liuos 3 (MDH/LDH) | 0,05 ml |
| näyte | 0,50 ml |

sekoitetaan ja inkuboidaan 5 min. 25°C vesihauteessa

liuos 4 (α -oxoglutaratti) 0,10 ml

sekoitetaan ja siirretään kyvetiin. Luetaan välittömästi lähtöabsorbanssi sekä tämän jälkeen absorbanssit tasan 1, 2 ja 3 minuutin kuluttua.

Lasketaan absorbanssin keskimääräinen muutos minuutissa ($\Delta A/\text{min.}$), jota käytetään laskutoimituksessa.

GOT-aktiivisuus U/l (25°C) = $1175 \times \Delta A_{340 \text{ nm}}/\text{min.}$

4.13 ALANIINIAMINOTRANSFERAASI AKTIIVISUUS (ALAT 1. GPT) (Vuorinen et al. 1978)

- menetelmä Henelev & Pollard (1955), joka pohjana Biochemica Boehringer GmbH:n testipakkauksessa
- ALAT-aktiivisuuden säilyvyys: säilyy homogenaattina +4°C:ssa 4 h, -20°C:ssa viikon, kudospäytteet säilyvät nestemäisessä työssä yli 2 viikkoa.

ALANIINIAMINOTRANSFERAASIAKTIIVISUUDEN (ALAT 1. GPT) SPEKTROFOTOMETRINEN MÄÄRITYS

Yleistä

Määritysohje sopii ainakin taimenen ja kirjolohen kudosten ASAT-määrityksiin. Näytteenä voi olla heparinisoituun ruiskuun imetystä verestä erotettu plasma tai kudoshomogenaatti. Jääkaapissa näytteet säilyvät neljä tuntia, tavallisessa pakastimessa ainakin viikon ja nestetyypessä vähintään kaksi viikkoa.

Näytteen valmistus

- kudokappaleet punnitaan tarkasti
- kudokappaleet homogenisoidaan - suorittaen Potter-Elvehjelm-homogenisaattorilla (Thomas, lasi-teflon) 15 ylös-alas -vaihetta (3000 kierrosta/min.) - 5-kertaisessa tilavuudessa (mitattava tarkasti) jääkylmää tislattua vettä. Homogenisoitaessa näytettä jäähdytetään jäähauteessa
- homogenaatti tehdään 0,5-prosenttiseksi detergentin (Triton X-100) suhteen, ja sen annetaan vaikuttaa 15 minuuttia; putkea pidetään jäähauteessa.

Plasma tai kudoshomogenaatti laimennetaan juuri ennen määrittystä 1-% NaCl:lla siten, että mitattaessa aallonpituudella 340 nm absorbanssi muuttuu 0,01-0,1 yksikköä minuutissa. Sopi-va homogenaatin kokonaislaimennus on 1:20-1:50 ja plasman 1:5-1:10.

Reagenssit

1. fosfaattipuskuri 0,1 mol/l, pH 7,4 (9,663 g KH_2PO_4 , 5,156 g Na_2HPO_4 . 2 H_2O /l tisl. vettä, säilytetään jääkaapissa)
2. L-alaniiniliuos 1,14 mol/l (101,829 g/l tisl. vettä, säilytetään jääkaapissa)
3. α -ketoglutaraaattiliuos 0,06 mol/l (9,350 g/l tisl. vettä, säilytetään jääkaapissa)
4. NADH (= nikotiiniamidiadeniinidinukleotidi)-liuos 6 mmol/l (4,540 g NADH- Na_2 /l tisl. vettä, tehdään päivittäin)
5. LDH (= laktaattidehydrogenaasi)liuos 350 U/ml (LDH, Boehringer n:o 127 868, laimennetaan 50 %:sella glyserolilla, säilytetään jääkaapissa)
6. NaCl (= natriumkloridi)-liuos 1 %:nen, säilytetään huoneenlämmössä
7. $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (= kaliumdikromaatti)-liuos 0,1 mmol/l (294 mg $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ /l tisl. vettä; käyttöliuos saadaan tästä laimentamalla 1/10 tisl. vedellä, säilytetään huoneenlämmössä).

Suoritus

Mittaus aallonpituudella 340 nm kyvetissä, jonka valotien pituus on 1 cm, ilmaa tai 0,1 mmol/l $K_2Cr_2O_7$ -liuosta vastaan; lämpötila 25°C.

Pipetoidaan

- 2,30 ml fosfaattipuskuria
- 0,35 ml L-alaniiniliuosta
- 0,05 ml NADH-liuosta
- 0,05 ml LDH-liuosta
- 0,20 ml näytettä

Inkuboidaan 25°C:n vesihauteessa 15 min.

Lisätään 0,25 ml α -ketoglutaratiliuosta.

Sekoitetaan.

Otetaan välittömästi nollalukema, ja sen jälkeen lukema 1, 2 ja 3 minuutin kuluttua.

Näytteen proteiinipitoisuus määritetään Lowry:n (1951, J.Biol.Chem. 193: 265-275) menetelmällä; plasmasta sellaisenaan ja kudoksenäytteestä homogenaatista.

Tulosten laskeminen

Homogenaatin aktiivisuus:

$$U/l = 2540 \times \Delta A/\text{min.} \times \text{laim. kerr.}$$

(jolloin laim. kerr. = homogenaatin laimennus määrittystä varten)

Aktiivisuus kudoksessa proteiinimäärää kohti:

$$U/\text{mg prot.} = \frac{U/l}{\text{mg prot./l}} \times 5$$

Aktiivisuus tuorepainoa kohti:

$$U/g = 2540 \times \Delta A/\text{min.} \times \text{laim. kerr.} \times \frac{V}{m}$$

missä V = homogenisointitilavuus 1 (puskuri + kudosa,
1 g = 1 ml)

m = kudoksen tuorepaino g

Pitoisuudet reaktioseoksessa

| | |
|--------------------------|-----------|
| puskuri | 72 mmol/l |
| L-alaniili | 125 " |
| α -ketoglutaratti | 5 " |
| NADH | 0,1 " |
| LDH | 5500 U/l |

4.14 ALKAALINEN FOSFATAASI (AP) AKTIIVISUUDEN MÄÄRITYS

Boehringer-Mannheimin kolorimetrisellä menetelmällä
(esim. tuotenumero 123 889)

Määritetään testipakkauksen ohjeen mukaisesti 25°C:ssa 1 cm kyvetissä aallonpituudella 410 nm seerumista tai plasmasta.

Mittaus

koeputkiin pipetoidaan

| | |
|---------------------------------------|---------|
| liuos 2 (glysiinipuskuri/substraatti) | 2,00 ml |
| näyte | 0,05 ml |

sekoitetaan ja inkuboidaan 1 min. 25°C:ssa, luetaan absorbanssi ja käynnistetään kello. Tämän jälkeen luetaan absorbanssit tasan 1, 2 ja 3 minuutin kuluttua.

Lasketaan absorbanssin muutos minuutissa ($\Delta A/\text{min.}$) ja käytetään tätä laskutoimituksissa.

AP-aktiivisuus U/l = $2216 \times \Delta A_{405 \text{ nm}}/\text{min.}$

4.15 HAPAN FOSFATAASIN AKTIIVISUUDEN MÄÄRITYS

Boehringer-Mannheimin kolorimetrisellä menetelmällä
(esim. tuotenumero 125 008)

Määrittäminen suoritetaan testipakkauksen ohjeen mukaisesti seerumista tai heparinoidusta plasmasta 37°C:ssa 1 cm kyvetissä blankoa vastaan aallonpituudella 405 nm.

Määrittäminen

| koeputkiin pipetoidaan | tyhjäkoe | näyte 1 | näyte 2 |
|------------------------|----------|---------|---------|
| liuos 2 (substraatti) | 1,0 ml | 1,0 ml | 1,0 ml |
| liuos 3 (tartraatti) | - | - | 0,1 ml |

inkuboidaan 5 min. 37°C:ssa ja lisätään:

| | | | |
|-------|---|--------|--------|
| näyte | - | 0,2 ml | 0,2 ml |
|-------|---|--------|--------|

lisää näyte 30 sek. välein, sekoita, inkuboi tasan 30 min. 37°C vesihauteessa

| | | | |
|-------------------------|---------|---------|---------|
| natriumhydroksiidiliuos | 10,0 ml | 10,0 ml | 10,0 ml |
| näyte | 0,2 ml | - | - |

tasaa 30 minuutin kuluttua lisätään natriumhydroksidi-liuos 30 sekunnin välein sekoitetaan, siirretään kyvetiin ja luetaan absorbanssi blankoa vastaan

kokonaisfosfataasiaktiivisuus U/l - $101 \times A_{\text{näyte 1}}$

4.16 ATP-MÄÄRITYS

Boehringer-Mannheimin UV-menetelmä
(tuotenumero 123 897)

Määritys suoritetaan verestä testipakkauksen ohjeen mukaan 25°C:ssa aallonpituudella 340 nm 1 cm kyveteissä ilmaa vastaan.

Verinäyte deproteinisoidaan jääkylmässä 0,6 N perkloorihapolla

| | |
|-----------------|--------|
| perkloorihappoa | 4,0 ml |
| verta | 1,0 ml |

sekoitetaan hyvin ja annetaan seistä 10 minuuttia 25°C:ssa. Tämän jälkeen sentrifugoidaan 10 minuuttia n. 3000 rpm. Supernatantti otetaan talteen.

Tämän jälkeen pipetoidaan

| | |
|-----------------------------------|--------|
| liuos 1 (puskuri-glyseraatti-3-P) | 2 ml |
| liuos 2 (NADH) | 0,2 ml |
| deproteinoitua supernatanttia | 0,2 ml |

sekoitetaan ja luetaan sähtöabsorbanssi A_1 .

Lisätään

| | |
|-----------------------------|---------|
| liuos 3 (GAPDH/PGK/GDH/TIM) | 0,02 ml |
|-----------------------------|---------|

sekoitetaan ja odotetaan kunnes reaktio pysähtyy (n. 10 min.) ja luetaan absorbanssi A_2 .

$$A_1 - A_2 = \Delta A$$

Lasku

$$\text{ATP konsentraatio } C \text{ (umol/l)} = 4656 \times \Delta A$$

4.17

DELTA-AMINOLEVULIINIHIAPPODEHYDRATAASI AKTIIVISUUS (ALA-D)
Menetelmä EEC 1975: Official Journal of the European
Communities No C 151/22-32 sekä BONSIGNORE, D et al. 1965.

Määritetään verestä, pernasta tai maksasta.
Heparinisoidusta verinäytteestä tehdään hematokriitti.
Ei suorassa auringonvalossa!

Suoritus

| | koe | tyhjäkoe |
|----------------------------|---------|----------|
| veri, ml | Hemoly- | 0,2 |
| 0,1 % NaCl, ml | sointi | 1,3 |
| ALA-liuos, ml | | 1,0 |
| TCA-HgCl ₂ , ml | | - |

Sekoitus huolellisesti (Vortex).
Inkubointi 37°C, 60 minuuttia.

| | | |
|----------------------------|-----|-----|
| TCA-HgCl ₂ , ml | 1,0 | - |
| ALA-liuos, ml | - | 1,0 |

Sentrifugointi 20 000 rpm 10 minuut-
tia.

Värireaktio

Supernatanttia (varottava höytyjä) 1 ml +
Ehrlichin reagenssia 1 ml.
Sekoitus.
Mittaus 5 minuutin kuluttua aallonpituudella 555 nm.

Liuokset

- 0,1 M fosfaattipuskuri
A: 1,76 g Na₂HPO₄ · 2H₂O/100 ml aq. dest.
B: 1,38 g NaH₂PO₄/100 ml aq. dest.
pH 6,4: 27,5 ml A + 72,5 ml B
- 0,01 M ALA-liuos
83,8 mg ALA-HCl/10 ml B-liuos. Tämän pH säädetään 6,4:ksi
lisäämällä liuosta A n. 40 ml. Täytetään 100 ml:ksi
0,1 M fosfaattipuskurilla. ALA-liuos säilyy 6 vrk
- TCA-HgCl₂
1,35 g HgCl₂/100 ml 10 % TCA-liuosta
- Ehrlichin reagenssi
2,5 g pDMAB
0,25 g HgCl₂/10 ml jääetikka
Perkloorihappo (väkevä)
Jääetikka
Valm.: pDMAB liuotetaan 50 ml:aan jääetikkaa, lisätään
24,5 ml perkloorihappoa ja 4 ml elohopeakloridiliuosta.
Sekoitetaan, jäähdytetään ja täytetään 100 ml:ksi jää-
etikalla. Reagenssi tehtävä päivittäin.

Entsyymiaktiivisuus mitattava 24 h:n kuluessa!

ALA-HCl Sigma no A 8879 (aminolevuliinihappo)
pDMAB Sigma no D 2004 (dimetyyliaminobenzaldehydi)

Periaate

Delta-aminolevuliinihappo $\xrightarrow{\text{ALA-D}}$ Porphobilinogeeni
Porphobilinogeeni + Ehrlichin reagenssi $\xrightarrow{\hspace{1cm}}$ Värillinen liuos

VIERASAINEENVAIHDUNTA

Kalojen kudoksista voidaan määrittää myös eräitä vierasaineen-
vaihduntaan osallistuvien entsyymien aktiivisuuksia. Tällai-
sia ovat mm. maksan ja munuaisen UDP-glukuronosyyli-transfe-
raasi (UDP-GT) sekä β -glukuronidaasi (BG). Näiden entsyymien
aktiivisuudet saattavat joko kohota tai alentua erilaisten
vierasaineiden vaikutuksesta.

4.18 BETA-GLUKURONIDAASI AKTIIVISUUS (Oikari, A ja Castren, M, julkaisematon)

1. Homogenisointi Ac-puskurissa (0,1 M pH 3,5)
2. Fraktiointi
3. Suoritus

| | koe | tyhjäkoe | |
|---------------|------|----------|---------------|
| Ac-puskuri ml | 0,35 | 0,35 | näyte säilyy |
| Näyte μ l | 100 | 100 | nestetyössä |
| PGA μ l | 50 | - | noin 1 viikon |

Inkubointi 1/2 h 35°C

Keskeytys: putket siirretään 100°C:een 1 minuutiksi

| | | |
|---------------------|------|------|
| PGA μ l | - | 50 |
| H ₂ O ml | 0,75 | 0,75 |

Sentrifugointi 10 minuuttia 2500 rpm

Värireaktio: 2 ml alkaalista glysiini-TCA -reagenssia + 1 ml
supernatanttia

Mittaus tyhjäkoetta vastaan 540 nm.

Aktiivisuus: μ M fenoliftaleiinia/mg prot./h.

Reagenssit

1. Asetaattipuskuri 1 M
Liuos A: 57,75 ml jääetikkaa/l H₂O
Liuos B: 135,0 g Na-asetaatia/l H₂O
2. Asetaattipuskuri 0,1 M
Liuoksista A ja B 1/10 laimennokset
pH 3,5: 140 ml A + 10 ml B

3. Alkaalinen glysiinireagenssi
 16,30 g glysiini
 12,65 g NaCl liuotetaan n. 970 ml vettä
 pH säädetään 11,7 lisäämällä 50 % (w/v) NaOH n. 16,8 ml
 ja täytetään 1 l
4. Alkaalinen glysiini-TCA-reagenssi
 25 ml alkaalista glysiinireagenssia
 3,5 ml TCA (5 % w/v)
 11,5 ml H₂O
 pH 10,5
5. PGA (P-0501 Sigma, Phenolphthalein glucuronic acid, free)
 5 mM PGA-liuos 2,47 mg/ml Loppukons. 0,5 mM
6. Fenoliftaleiinistandardi 0,5 mg/ml 96 % EtOH

Laskenta

$$\frac{E \times 1,25 \times \text{näytteenlaim.} \times 1000}{30 \times 62 \times 0,1} = \frac{33,602 \times E \text{ mmol/ml/min.}}{6,720 \times E \text{ ml homog./min.}}$$

4.19 UDP-GLUKURONOSYYLITRANSFERAASI AKTIIVISUUS (Oikari, A ja Castren, M, julkaisematon)

Määritetään nestetyppeen säilötyistä näytteistä seuraavasti:

1. Homogenisointi 0,25 M sakkaroosiassa pH 7,0 (20 % w/v)
2. Fraktiointi
3. Suoritus

| | koe | tyhjäkoe | Loppukons. |
|--|-----|----------|--|
| Fosfaattipuskuri + p-NP + K ₂ EDTA μ l | - | 100 | K ₂ EDTA 3,3 mM p ² -NP 117 μ M |
| UDPGA-liuos μ l | 100 | - | |
| Näyte μ l | 200 | 200 | |
| Inkubointi 20°C, 20 min. 3 % TCA ml | 0,9 | 0,9 | |
| Sentrifugointi 10 min., 2500 rpm | | | |
| Supernatantti + 100 μ l 5 N NaOH | | | |

Mittaus vettä vastaan 400 nm.

Reagenssit

1. Sakkarooosi 0,25 m 21,394 g/250 ml H₂O
2. Fosfaattipuskuri 0,5 M pH 7,0
(5 N KOH) 34,023 g/500 ml H₂O
+ 2,0224 g K₂EDTA (10 mM)
+ 24,4 mg p-nitrofenolia
(0,35 mM)
3. UDPGA-liuos 4 mg UDPGA/ml puskuri
(U 5625 Sigma Uridine-5-
diphospho-glucuronic acid
ammonium salt)

p-nitrofenolin molaarinen absorptiokerroin (pH 9,0)
18,8 cm²/umol

Ref. Pontis, H.G. & LeLoir, L.F. 1962: Measurement of UDP-enzyme systems. - In: Methods of Biochemical Analysis (ed. Glick, D.). Interscience Publishers, John Wiley & Sons, New York/London. vol. 10: 97-136.
Hänninen, O. 1966: Effect of salicylamide administration on D-glucuronic acid metabolism in the rat. - Ann. Acad. Sci. Fennicae, Ser. A V (123): 1-66.

Laskenta

$$\frac{E \times 1,3}{0,0188 \times 20 \times 0,2} = 17287 \times E \text{ pmol/ml/min.}$$

5. HISTOLOGISTEN NÄYTTEIDEN KÄSITTELY (vrt. 3.4)

Histologisten näytteiden jälkikäsitteilyssä fiksointineste pestään pois kudoksista vedessä tai etanolissa ja kudokset vietään etanolisarjan kautta paraffiinin liuottimeen ja siitä sulaan paraffiiniin.

Käsittelyvaiheet:

| | |
|--|---------|
| 70 % etanoli (vaihto 2-3 kertaa) | 12-24 t |
| 94 % etanoli | 12-24 t |
| 94 % etanoli + butanoli 1:1 | 12-24 t |
| butanoli I | 12-24 t |
| butanoli II | 12-24 t |
| sula paraffiini jossa n. 5 % mehiläisvahaa | 24-48 t |

Kun butanoli on haihtunut sulasta paraffiinista on paraffiini tunkeutunut kudokseen ja kudokskappale on valmis valettavaksi. Muotittiin kaadetaan sulaa paraffiinia ja kudokskappale nostetaan siihen varovasti lämmitetyillä pinseteillä ja asetetaan

sopivaan asentoon. Paraffiinin annetaan jähmettyä. Paraffiinin jähmetyttyä muotti poistetaan ja paraffiiniblokki työstetään halutun kokoiseksi leikkaamista varten. Blokki kiinnitetään puupalikkaan. Leikkaaminen suoritetaan mikrotomilla, näyte kiinnitetään objektilasille, värjätään ja peitetään. Tämän jälkeen näyte on valmis mikroskooppista tarkastelua varten.

Paraffiinitekniikan lisäksi on mahdollista käyttää muovi-leiketekniikkaa.

N Ä Y T T E I D E N V Ä R J Ä Ä M I N E N

Jotta leikkeet värjääntyisivät, on niistä liuotettava paraffiini pois, tavallisimmin ksyleenissä. Ksyleeni puolestaan pestään pois absoluuttisessa etanolissa. Sen jälkeen lasit viedään laimenevan etanolisarjan kautta veteen ja sitten väriliuokseen.

Käsittelyvaiheet:

| | |
|-----------------------|--------|
| ksyleeni I | 5 min. |
| ksyleeni II | 5 min. |
| absoluuttinen etanoli | 2 min. |
| 96 % etanoli | 2 min. |
| 70 % etanoli | 2 min. |
| tislattu vesi | 2 min. |

Väriliuosten jälkeen lasit viedään samassa sarjassa takaisin-päin. Viimeisenä on ksyleeni johon peittämisaineet liukenevat.

Esimerkkinä Masson-Gomori värjäys

- Liuokset:**
- Mayerin hematoksyliiniliuos
- 1 g hematoksyliiniä liuotetaan 1000 ml:aan tislattua vettä. Tähän liuotetaan edelleen:
 - 50 g kalialunaa
 - 0,2 g NaJO₃
 - 50 g kloralhydraattia
 - 1 g sitruunahappoa

Liuos on heti valmista käytettäväksi.

Liuos A:

- 1 ml jäätikkää/100 ml tislattua vettä
- 0,6 g Cromotrop 2R
- 0,3 g FAFST Green FCF
- 0,6 g fosforiwolframihappoa

Liuos B:

- 0,2 % etikkahappoliuos

Värjäys: Ksyleeni I etanoli 70 %
 tislattu vesi 2 min.
 Mayerin hematoksyliiniliuos 4-6 min.
 juokseva vesi 15 min.
 Liuos A 10 min.
 Liuos B nopea huuhtelu
 tislattu vesi 2 min.
 etanoli 70 % ksyleeni II

Peittäminen: Ksyleeni II jälkeen esim. Entellanilla.

Tulos: Tummat sinipunaisia. Solulima, veriplasma ja sidekudos vihreitä. Punasolut punaisia ja lihaskudos punasiniistä.

7. F I K S O I N T I L I U O K S E T

Puskuroitu formaliini

| | |
|---|--------|
| 40 % formaliinia | 100 ml |
| tislattu H ₂ O | 900 ml |
| NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O | 4 g |
| Na ₂ HPO ₄ | 6 g |

Bouin'in liuos

| | |
|-------------------------------------|--------|
| pikriinihapon kyllästetty vesiliuos | 300 ml |
| 40 % formaliini | 100 ml |
| jääetikka | 20 ml |

Glutaraldehydi-liuos

| | |
|---|----------------------------|
| 0,2 M fosfaattipuskuria | 50 ml |
| 25 % glutaraldehydiluoosta | 12 ml |
| Tislattua vettä kunnes yhteis- tilavuus on | 100 ml |
| Neste sisältää 3 % glutaraldehydiä | 0,1 M fosfaattipuskurissa. |

Fosfaattipuskuri (0,2 M)

| | | | |
|---------------|--|---------|-------------------------------|
| Liuos A | Na H ₂ PO ₄ · H ₂ O | 13,8 g | 500 ml |
| | tai Na H ₂ PO ₄ · 2 H ₂ O | 15,6 g | tislattua H ₂ O |
| Liuos B | Na HPO ₄ | 14,2 g | 500 ml |
| | tai Na ₂ HPO ₄ · 7 H ₂ O | 26,8 g | tislattua vettä |
| | tai Na ₂ HPO ₄ · H ₂ H ₂ O | 35,8 g | |
| Puskuriliuos: | pH 7,2 | pH 7,4 | |
| Liuos A | 28,0 ml | 19,0 ml | |
| Liuos B | 72,0 ml | 81,0 ml | |

8. K I R J A L L I S U U S

- Augustinson, K.-B., 1957: Assay methods for cholinesterases. pp. 1-63 in: Click, D., 1957: Methods of Biochemical Analysis. - John Wiley & Sons. New York.
- Bonsignore, D., Calissand, P. & Cartasegna, C., 1965: Un semplice metodo per la determinazione della α -amino-levulinico-deidratasi del sangue. - Med. Lavoro vol 56 (3), 199-205.
- Cannon, D.C., Olitzky, I. & Inkpen, J.A., 1974: Determination of total protein in serum or plasma. in: Henry, R.J., Cannon, D.C. & Winkelman, J.W., Eds., 1974: Clinical Chemistry. Principles and technics. - Harper & Row. New York.
- EEC, 1975: Official Journal of the European Communities n:o C 151/22-32.
- Harris, R.C., Hultman, E. & Nordesjö, L.O., 1974: Glycogen, glycolytic intermediates and high-energy phosphates determined in biopsy samples of musculus quadriceps femoris in man at rest. Methods and variance of values. - Scand. J. clin. Lab. Invest. 33, 109-120.
- Heneley, K.S. & Pollard, H.M., 1955: A new method for the determination of glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminase in plasma. - J. Lab. clin. Med. 46, 785-789.
- Hesser, E.F., 1960: Methods for routine fish hematology. - Progr. Fish Cult. 22, 164-172.
- Hickey, Jr., C.R., 1976: Fish hematology, its uses and significance. - N.Y. Fish Game J. 23, 170-175.
- Joshi, B.D., 1974: Effect of starvation on blood glucose and nonprotein nitrogen levels of the fish Clarias batrachus. - Experientia 30, 772-773.
- Karmen, A., 1955: A note on the spectrophotometric assay of glutamic-oxalacetic transaminase in human blood serum. - J. clin. Invest. 34, 131-133.
- Klontz, G.W. & Smith, L.S., 1968: Methods of using fish as biological research subjects. pp. 323-385 in: Cay, W.I., Ed., 1968: Methods of Animal Experimentation III. - Academic Press. New York.

- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J., 1951: Protein measurements with the Folin phenol reagent. - J. biol. Chem. 193, 265-275.
- Madden, J.A. & Houston, A.H., 1976: Use of electroanaesthesia with freshwater teleosts: some physiological consequences in the rainbow trout, Salmo gairdneri Richardson. - J. Fish Biol. 9, 457-462.
- Oikari, A., Lönn, B.-E., Nyholm, K., Vuorinen, M., Soivio, A. & Vuorinen, P.J., 1978: Kalojen laktaattidehydrogenaasin käyttämisestä ympäristömyrkkytutkimuksissa sekä määrittämenetelmien tarkistaminen kirjolohella. - PuPro-moniste, Helsinki elokuu 1978, julkaisematon
- Oikari, A., Vuorinen, P.J., Vuorinen, M., Soivio, A., Nyholm, K. & Castrén, M., 1978: Kalojen koliiniesteraasin käyttämisestä ympäristömyrkkytutkimuksissa sekä määrittämenetelmien tarkistaminen kirjolohella. - PuPro-moniste, Helsinki syyskuu 1978, julkaisematon
- Railo, E., 1980: Näytteenoton aiheuttaman häirinnän vaikutuksista kirjolohen (Salmo gairdneri Richardson) punasolujen tilavuuden muutoksiin in vitro. - Pro gradu, University of Helsinki, Department of Zoology, M.S. 65 pp. (in Finnish).
- Soivio, A. & Nikinmaa, M., 1980: Lohikalojen fysiologisesta tilasta kuljetuksen ja sitä seuraavan toipumisen aikana. - Suomen Kalatalous, in press.
- Soivio, A., Nyholm, K. & Huhti, M., 1977: Effects of anaesthesia with MS 222, neutralized MS 222 and benzocaine on the blood constituents of rainbow trout, Salmo gairdneri. - J. Fish Biol. 10, 91-101.
- Soivio, A., Nyholm, K. & Westman, K., 1973: Notes on haematocrit determinations on rainbow trout, Salmo gairdneri. - Aquaculture 2, 31-35.
- Soivio, A., Nyholm, K. & Westman, K., 1975: A technique for repeated sampling of the blood of individual resting fish. - J. exp. Biol. 62, 207-217.
- Soivio, A., Nyholm, K., Vuorinen, P.J., Vuorinen, M. & Oksa, H., 1978: Kalojen glukoosi-, glykokeeni- ja laktaattimäärittäyksistä ympäristömyrkkytutkimuksissa sekä määrittämenetelmien tarkistaminen kirjolohella. - PuPro-moniste, Helsinki kesäkuu 1978, julkaisematon

- Soivio, A. & Oikari, A., 1976: Haematological effects of stress on a teleost, Esox lucius L. - J. Fish Biol. 8, 397-411.
- Soivio, A., Oikari, A., Ruoppa, M. & Miettinen, V., 1978: Experimental field toxicology; transport, water temperature and hydrostatic pressure as factors affecting some clinical parameters of fish. pp. 249-259 in: Toxicitetstester. Fjortonde Nordiska Symposiet om Vattenforskning. Ålborg, 25-27 april 1978. - NORDFORSK, Miljövårdssektariatet. Publikation 1978:2.
- Soivio, A. & Virtanen, E., 1980: Methods for Physiological Experiments on fish. - Nordforsk, Ekotoxikologiska metoder för akvatisk miljö, Rapport Nr 16.
- Solomon, D.J. & Taylor, A.L., 1979: Critical factors in the transport of live freshwater fish - II. State of feeding and ammonia excretion. Fish. Mgmt 10, 81-85.
- Taylor, A.L. & Solomon, D.J., 1979: Critical factors in the transport of live freshwater fish. I. General considerations and atmospheric gases. - Fish. Mgmt 10, 27-32.
- Wedemeyer, G., 1970: Stress of anaesthesia with MS 222 and benzocaine in rainbow trout (Salmo gairdneri) - J. Fish. Res. Bd. Canada 27, 909-914.
- Wedemeyer, G. & Yasutake, W., 1977: Clinical methods for the assessment of the effects of environmental stress on fish health. - U.S. Fish and Wildlife Serv. Tech. Paper 89, Wash., D.C., U.S.A. 18 pp.
- Vuorinen, P.J., Vuorinen, M., Nyholm, K., Oikari, A., Soivio, A. & Nakari, T., 1978: Kalojen aspartaatti- ja alaniiniaminotransferaasin käyttämisestä ympäristömyrkkytutkimuksissa sekä määrittämenetelmien tarkistaminen kirjolohella ja taimenella. - PuPro-moniste, Helsinki heinäkuu 1978, julkaisematon.
- Wroblewski, F. & LaDue, J.S., 1955: Lactic dehydrogenase activity in blood. - Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 90, 210-213.

